

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 novembre 2004 (04.11.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/094464 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C07K 7/06,
C07C 237/22, C07K 5/062, 5/083, 5/103

(74) Mandataire : CABINET CLAUDE BES; 2bis, rue de
Verdun, F-34000 Montpellier (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/001021

(22) Date de dépôt international : 2 avril 2003 (02.04.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : BIO-
PHYTECH SAS [FR/FR]; Zone des Près d'Arènes, 11, rue
du Lantissargues, F-34000 Montpellier (FR). CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
[FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BESNARD,
Olivier [FR/FR]; 69, Avenue de Castelnau, F-34400
Montpellier (FR). MARTINEZ, Jean [FR/FR]; 1, rue
des Cévennes, F-34720 Caux (FR). CAVELIER, Florine
[FR/FR]; 7, rue du Maréchal Lefèvre, F-34170 Castelnau
le Lez (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: OLIGOPEPTIDES, COMPOSITION AND USE THEREOF AS ELICITORS OF THE NATURAL DEFENCES OF
PLANTS

(54) Titre : OLIGOPEPTIDES, COMPOSITION ET UTILISATION COMME ELICITEURS DES DEFENSES NATURELLES
DES PLANTES

(57) Abstract: The invention relates to oligopeptides used as elicitors of the natural defences of plants in order to control fungal
and/or bacterial and/or viral pathogens and/or crop pests, by means of foliar or root application or by injection. According to the
invention, said oligopeptides are characterised in that they are obtained by organic or enzymatic synthesis, in that they are heteropoly-
mers and/or homopolymers of protein and/or non-protein amino acids, and in that said amino acids form sequences of said polymers
selected for the capacity thereof to form spiral structures.

(57) Abrégé : L'invention concerne des oligopeptides utilisés comme éliciteurs des défenses naturelles des plantes contre les patho-
gènes fongiques et/ou bactériens et/ou viraux et/ou ravageurs par application foliaire, racinaire ou par injection. Les oligopeptides,
selon l'invention, se caractérisent en ce qu'ils sont obtenus par voie de synthèse organique ou enzymatique ; en ce qu'ils ont la par-
ticularité d'être des hétéro et/ou homopolymères d'acides aminés protéiques et/ou non protéiques et en ce que lesdits acides aminés
constituent des séquences desdits polymères qui sont choisis pour leur propriété à former des structures des types hélicoïdales.



WO 2004/094464 A1

2/PRts.

JC05 Rec'd PCT/PTO 03 OCT 2005

- 1 -

OLIGOPEPTIDES, COMPOSITION ET UTILISATION COMME ELICITEURS DES DEFENSES NATURELLES DES PLANTES

DESCRIPTION

L'invention concerne des oligopeptides utilisés comme éliciteurs des défenses naturelles des plantes contre les pathogènes fongiques et/ou bactériens et/ou viraux et/ou ravageurs, par application foliaire, racinaire ou par injection, et obtenus par voie de synthèse organique ou enzymatique.

5 Les matières actives des préparations phytosanitaires peuvent avoir une action directe sur les micro-organismes, c'est le cas des molécules inhibant certaines voies métaboliques des cellules ou qui affectent leur organisation. Il s'agit généralement d'un traitement curatif.

10 En lutte biologique, le traitement curatif est assuré par l'utilisation d'un agent antagoniste ou parasitaire. De même, on emploie un micro-organisme très compétitif pour la colonisation de l'espace quand il s'agit d'un traitement préventif.

Les matières actives des préparations phytosanitaires peuvent avoir la propriété d'agir indirectement en activant le système de défense naturel (SDN) de la plante. Ceci se traduit par la sensibilisation de la plante à une éventuelle attaque ultérieure de la part du pathogène. A cette étape, les gènes responsables de la synthèse des protéines de défense et des phytoalexines se trouvent activés, et les produits correspondants sont synthétisés dès le premier contact entre la cellule végétale et son agresseur. On parle alors d'un traitement curatif par le biais d'éliciteurs.

20 Les réactions de défenses peuvent être localisées au niveau du site d'attaque, il s'agit d'une réaction d'hypersensibilité (HR) qui provoque la mort cellulaire.

Elles peuvent se généraliser et aboutir à une résistance systémique acquise (SAR). Globalement, deux mécanismes de défense concourent à freiner la propagation de la maladie. D'une part, sur le site de pénétration du pathogène, les cellules infectées s'autodétruisent pour retarder sa progression (réaction d'hypersensibilité). D'autre part, des signaux d'alertes aux cellules avoisinantes créent une zone de résistance locale acquise où s'accumulent de nombreux composés de défense. Des signaux sont également transmis à la plante entière, aboutissant ainsi à une résistance systémique acquise (SAR).

30 La particularité innovante de cette invention se situe au niveau du nouveau mode d'action qui est préventif. En effet, cette nouvelle classe d'éliciteurs permet de simuler une attaque de pathogènes au niveau des cellules végétales. Ces dernières vont enclencher un mécanisme naturel de défense qui va provoquer une SAR et ce, au moins une fois, ce qui permettra de prévenir encore plus efficacement l'attaque.

De très faibles quantités d'éliciteurs suffisent pour sensibiliser la membrane cytoplasmique. Ainsi, le seuil de détection des éliciteurs par les plantes peut atteindre une valeur de 10^{-9} Molaire ou même plus basse (Boller et al. 1995 ; Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.).

5 ELICITEURS

Depuis l'introduction du terme éliciteur par Keen et al. (1972, Phytopathology), il a été démontré que plusieurs substances de structures chimiques diverses possèdent la propriété d'activer les systèmes naturels de défense (SDN) des plantes. Ce sont notamment ceux d'origine abiotique et qui sont représentés par les ions
10 mercuriques, cupriques, aluminiques, les acides arachidonique, phosphorique, salicylique, fulvique et humique. Il existe aussi des éliciteurs biotiques dont les plus connus sont :

Les oligosaccharides : ils font partie des premiers éliciteurs à être les mieux caractérisés (Darvill and Albersheim (1984, Annu. Rev. Plant. Physiol)). Ils se
15 composent de 4 classes : oligoglucannes, oligochitine, oligochitosane, oligogalacturonides, d'origine végétale [Côté et al. (1994, Plant Mol. Biol)].

Oligoglucannes : l'hepta- β -glucoside ramifié en positions (1,3-1,6) est le plus petit oligoglucoside connu pour son action élicitrice. Il a été isolé à partir de *Phytophthora sojae*.

20 La chitine : c'est un polymère linéaire de (1,4)-N-acétyl- β -glucosamine qui se rencontre chez les champignons supérieurs et représente le constituant majeur de leurs mycella. La partie soluble de la chitine (libérée par l'action des chitinases végétales), provoque la lignification et la production de phytoalexines chez certaines plantes [Pearce et al. (1982, Physiol. Plant Pathol), Ren et al. (1992, Plant Physiol)]

25 Les oligogalacturonides : ils sont probablement libérés par la dégradation des homogalacturonanes (polysaccharides pectiques) suite à une attaque du pathogène contre la plante. Ces homogalacturonanes sont composés de résidus de l'acide 1,4- α -D-galactosyluronique et entrent dans la composition des parois cellulaires des plantes supérieures [Côté et al. (1994, Plant Mol. Biol)].

30 Les enzymes :

Boland et al. (1997, FEBS Letters) ont démontré que le traitement de certaines plantes par une cellulase commerciale déclenche la biosynthèse de produits volatils via la voie de signal de l'acide octadécanoïque.

Klūsener et al. (1999, FEBS Letters) ont étudié les interactions entre des enzymes
35 cellulolytiques d'une part, et un éliciteur issu d'une culture de levure (*Eschscholtzia*

californica) d'autre part, avec des bicouches lipidiques. Ils sont arrivés à la conclusion que les éliciteurs peuvent dépolariser les membranes cytoplasmiques, influencer les flux ioniques à travers celles-ci et même perturber leurs organisations dans certains cas. Certains éliciteurs n'ont donc pas besoin de réagir avec les protéines intracellulaires pour provoquer des réponses de défense chez la plante. Ceci expliquerait le large spectre de certaines molécules.

Les polypeptides et protéines :

Certains glycopeptides et/ou oligosaccharides libres dérivés des glycoprotéines sont actifs en terme d'élicitation [Anderson et al. (1989,), Ebel et al. (1995, Can. J. Bot), Boller et al. (1995, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol)].

Dans les glycoprotéines de *Colletotrichum lindemuthianum* (Coleman et al. 1992, Physiol Mol Plant Pathol) et de *Puccinia graminis f.sp. tritici* (Kogel et al. 1988, Physiol Mol Plant Pathol), les parties glucidiques sont responsables de l'activité élicitrice.

Un groupe de bactéries phytopathogènes de type Gram-négatif produit des protéines élicitrices de la HR chez des plantes non-hôtes. Par exemple, *Erwinia amylovora* (Wei et al. 1992, Science ; Baker et al. 1993, Plant Physiol) possède le gène *hrpN* qui code pour la production d'une harpin, et *Pseudomonas syringae* pv.*syringae* (He et al. 1993, Cell) sécrète une harpine_{ss} qui est le produit du gène *hrpZ*. La protéine (*HrpN*) issue d'*Erwinia amylovora* stimule le flux extracellulaire des cations K⁺ et régule ainsi les courants dans les cellules d'*Arabidopsis thaliana*.

Une protéine de 18 kDa sécrétée par une souche de *Trichoderma virens* a été isolée et caractérisée par Hanson et al. (2000, Phytopatology). Cette protéine est capable d'induire la biosynthèse des produits de types terpenoïdes dans le coton.

Benhamou et al. (2000, Plant physiology) décrivent qu'une protéine (oligandrin) de faible poids moléculaire, et issue de *Pythium oligandrum*, induirait une réaction de défense chez les plants de tomates. Cette réaction limiterait la progression de la maladie causée par l'agent phytopathogène *Phytophthora parasitica*.

La cryptogéine est une protéine sécrétée par le champignon *Phytophthora cryptogea* (Blein et al. 1997, FEBS Letters) qui s'en sert pour le transport du stérol. Elle est aussi connue pour ses propriétés stimulatrices de la défense des plantes (Ricci et al. 1989, Eur. J. Biochem)

Oligopeptides :

Le champignon *Phytophthora sojae* produit une glycoprotéine dont une partie (42 kDa) possède la propriété élicitrice. On a même identifié dans la moitié C-terminale

de cette glycoprotéine, un oligopeptide de 13 acides aminés qui serait aussi actif [(Parker et al. 1991, Mol Plant-Microbe Interact.), (Nürnberg et al. 1994, Cell), (Sacks et al. 1995, Mol Gen Genet.)]. Une structure spécifique et une longueur minimale de la séquence sont essentielles pour que cet oligopeptide garde son activité intacte. Des phénomènes similaires ont été observés dans le cas de la systemine (Pearce et al. 1993, J. Biol Chem).

Plusieurs espèces de *Phytophthora* sécrètent des protéines extracellulaires de faible poids moléculaire (10 kDa) appelées élicitines [(Ricci et al. 1992, Plant Pathol), (Kamoun et al. 1994, Appl Environ Microbiol), (Boissy et al. 1996, Structure)]. Ces molécules sont capables de provoquer des réactions d'hypersensibilité ainsi qu'une résistance systémique acquise [(Ricci et al. 1989, Eur. J. Biochem, 183 (3)), (Kamoun et al. 1993, Mol Plant-Microbe Interact)].

Le peptide AVR9 *Cladosporium fulvum* est un éliciteur (Wit et al. 1997, Mol Plant-Microbe Interact) de la réaction d'hypersensibilité chez les plants de tomate possédant le gène de résistance (MM-Cf9).

Acides aminés :

Siegrist et al.(2000, Physiological and Molecular Plant pathology) ont étudié la capacité de certains aminoacides à déclencher la SAR chez les plants de tabac. En travaillant avec des concentrations de 10 mM, ils ont observé les résultats suivants :

l'acide β -aminobutyrique est actif,
l'acide α -aminobutyrique est peu actif,
l'acide γ -aminobutyrique est totalement inactif.

SPECIFICITE DE L'INVENTION

La spécificité de l'invention repose sur l'utilisation d'Oligopeptides hélicoïdaux.

Les travaux de Boland et al. (2000, Angew. Chem. In. Ed.) ont montré que les peptaibols induisent la biosynthèse de produits volatils chez certaines plantes. Ceci serait dû à leur capacité à former des canaux ioniques dans les membranes cellulaires. Ces types d'actions semblent être ceux qui enclencheraient la stimulation de la défense naturelle la plus forte qui soit. Ils seraient dus notamment à une nécrose localisée des cellules touchées qui induisent une alerte généralisée auprès des cellules adjacentes et des tissus.

Selon Pedras et al. (1997, Phytochemistry), la destruxine B (oligodepsipeptide cyclique) sécrétée par le champignon *Alternaria brassicae* lors de l'attaque des crucifères induirait la biosynthèse d'une phytotoxine appelée sinalexine.

Bodo et al. (1998, Biochem. et Biophys. Acta) ont étudié l'interaction des peptaibols

- 5 -

avec les liposomes [vésicules unilamellaires larges (LUV)]. Ils ont pu montrer que le processus majeur impliqué dans l'échange ionique à travers la membrane serait le mode « tout ou rien ». La formation de pores suffisamment larges est donc essentielle pour la transition des différents ions. Ceci est assuré par la formation d'un complexe supramoléculaire entre un agrégat de 3 à 4 monomères peptidiques et les molécules lipidiques.

Yeo et al. (2000, Tetrahedron Letters) ont démontré l'activité inhibitrice des peptavirines A et B contre le virus de la mosaïque du tabac. Une inhibition de 74 à 79% a été observée en utilisant des concentrations de 10 µg/ml. Ces auteurs parlent d'un mécanisme d'action directe des peptavirines dans l'inhibition du pathogène, mais en aucun cas ils n'évoquent l'action élicitrice de ces peptaibols.

L'invention concerne l'obtention d'oligopeptides hélicoïdaux par synthèse peptidique. Les structures hélicoïdales de ces peptides se logent à l'intérieur des membranes cellulaires. Quand plusieurs de ces molécules sont insérées ensembles dans la membrane, elles forment un canal ou un pore, qui altère la perméabilité membranaire (dépolarisation). L'originalité de cette invention est donc de clarifier, optimiser et obtenir ces structures moléculaires qui permettent à coup sûr de former ces « pores ».

SYNTHESE DE POLYMERES D'AMINOACIDES

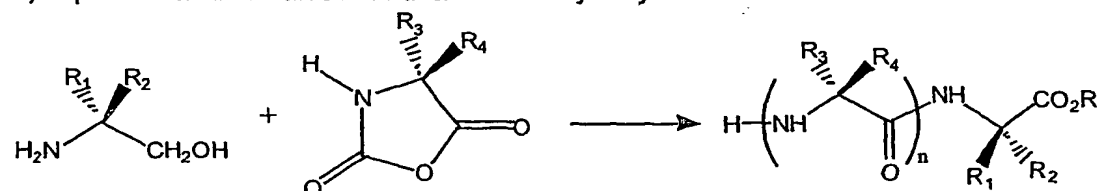
A – Polymères obtenus en mélanges

1. Obtention de polyaminoacide-alcools :

La réaction entre un aminoalcool dérivé d'un acide aminé et d'un N-Carboxyanhydride dérivé d'un aminoacide, identique $R_1=R_3$ et $R_2=R_4$, ou différent, dans un solvant organique et sous conditions non stoechiométriques, aboutit à la formation d'un mélange d'homopolymères ou d'hétéropolymères respectivement.

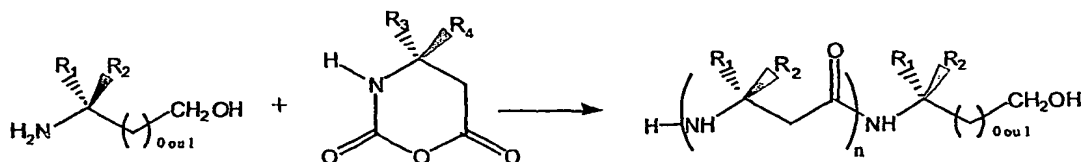
Le procédé permettant l'obtention de ce type de produits peut être décrit par le schéma réactionnel suivant :

a) A partir d' α -aminoalcool et d' α -N-carboxyanhydride



b) A partir d' α -aminoalcool, β -aminoalcool et β -N-carboxyanhydride (Cheng et al, 2000, Organic letters)

- 6 -



Dans les deux cas a et b : R = H, alkyl, alkyl substitué.

Selon la configuration L ou D des aminoacides utilisés :

- R₁ et R₃ = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles) : R₁ et R₃ peuvent être identiques ;
- R₂ et R₄ = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles) ;
- n est compris entre 3 et 30.

10 Procédé de synthèse :

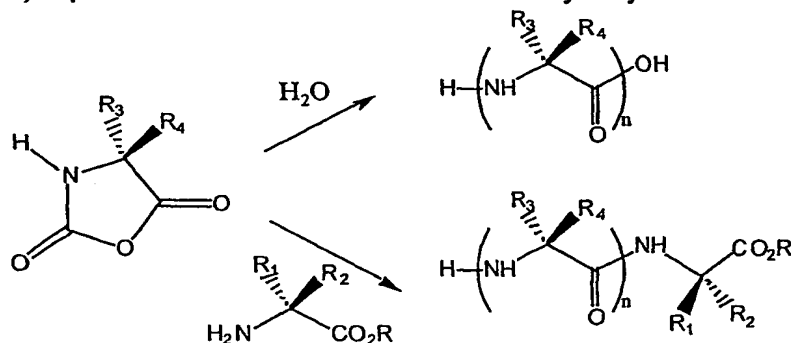
A 20 équivalents de NCA (N-carboxyanhydride α ou β) d'acide aminé dissous dans le solvant choisi (dichlorométhane, diméthylformamide, acétonitrile, 20 ml de solvant par équivalent de NCA d'acide aminé α ou β), est ajouté 1 équivalent d'acide aminé alcool (α ou β). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 6 à 48 heures, selon l'acide aminé utilisé. Le précipité obtenu est alors filtré.

Exemples :

Alaninol	R ₁ = CH ₃	R ₂ = H
NCA de l'alanine :	R ₃ = CH ₃	R ₄ = H
NCA de l'acide glutamique	R ₃ = CH ₂ CH ₂ COOBzl	R ₄ = H
20 NCA de la valine	R ₃ = CH(CH ₃) ₂	R ₄ = H

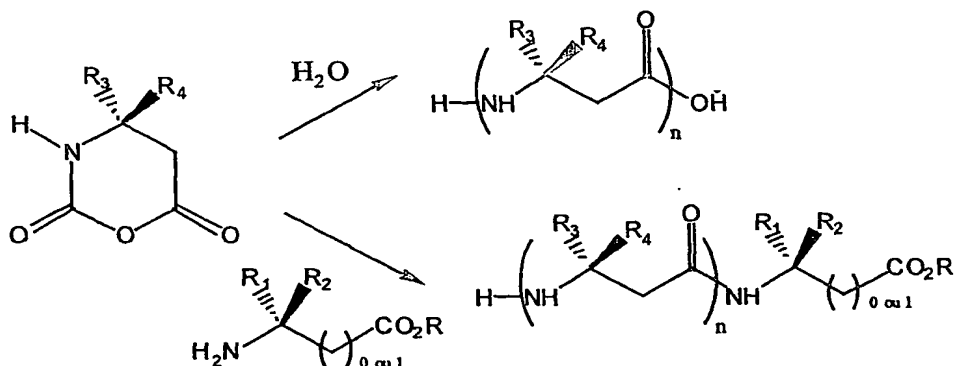
2- Obtention de polyaminoacides :

a) A partir d' α -aminoacide et d' α -N-carboxyanhydride



b) A partir d' α -aminoacide, β -aminoacide et β -N-carboxyanhydride

- 7 -



Dans les deux cas a et b : $R = H$, alkyl, alkyl substitué.

Selon la configuration L ou D des aminoacides utilisés :

- R_1 et $R_3 = H$, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles). R_1 et R_3 peuvent être identiques ;
- R_2 et $R_4 = H$, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles). R_2 et R_4 peuvent être identiques ;
- n est compris entre 3 et 30.

Procédé de synthèse :

A 20 équivalents de NCA (N-carboxyanhydride α ou β) d'acide aminé dissous dans le solvant adéquat (dichlorométhane, diméthylformamide, acétonitrile, 20 ml de solvant par équivalent de NCA d'acide aminé α ou β), est ajouté 1 équivalent d'eau.

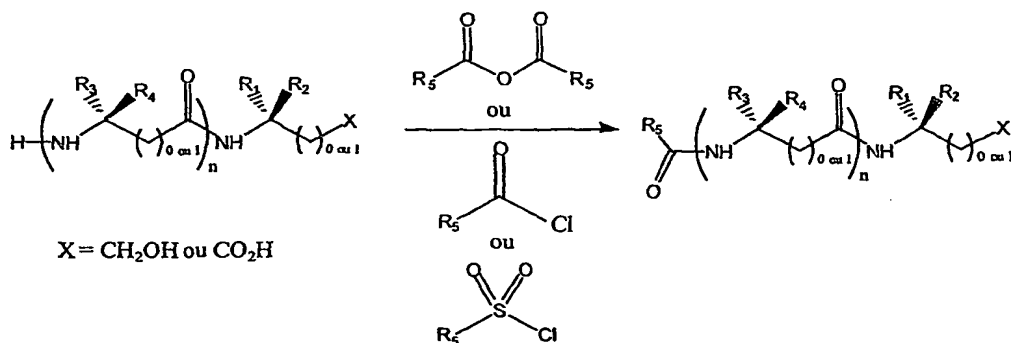
- La réaction est agitée à température ambiante pendant 6 à 48 heures. On filtre le précipité obtenu.

Exemples :

- | | | |
|---------------------------|------------------------|-----------|
| NCA de l'alanine : | $R_3 = CH_3$ | $R_4 = H$ |
| NCA de l'acide glutamique | $R_3 = CH_2CH_2COOBzl$ | $R_4 = H$ |
| NCA de la valine | $R_3 = CH(CH_3)_2$ | $R_4 = H$ |

3. Obtention de polymères acylés :

- 8 -



R = H, alkyl, alkyl substitué.

Selon la configuration L ou D des aminoacides utilisés :

- R₁ et R₃ = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles). R₁ et R₃ peuvent être identiques ;
- R₂ et R₄ = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles). R₂ et R₄ peuvent être identiques ;
- n est compris entre 3 et 30.

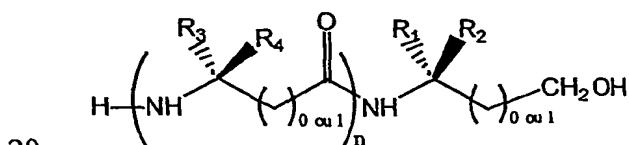
Procédé d'acylation :

250 mg de produits à acyler sont placés en suspension dans 30 ml de diméthylformamide. 15 équivalents d'agent acylant (anhydride acétique, anhydride décanoïque, etc...) sont ajoutés. La réaction est agitée à température ambiante (de 16 heures à 48 heures).

Après filtration, un solide blanc poudreux est obtenu.

B – Polymères obtenus purs et caractérisés

1. Polyaminoacide-alcools :



R = H, alkyl, alkyl substitué.

Selon la configuration L ou D des aminoacides utilisés :

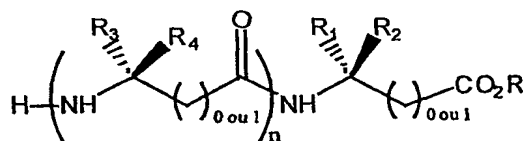
- R₁ et R₃ = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles). R₁ et R₃ peuvent être identiques ;

- 9 -

- R_2 et R_4 = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles). R_2 et R_4 peuvent être identiques ;

- n, compris entre 3 et 20, est défini pour chaque composé.

5 2. Polyaminoacides :



R = H, alkyl, alkyl substitué.

Selon la configuration L ou D des aminoacides utilisés :

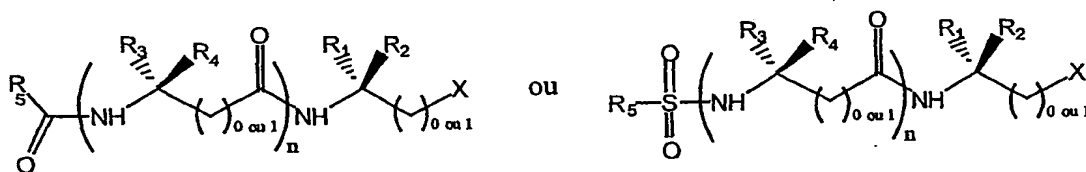
10 - R_1 et R_3 = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles). R_1 et R_3 peuvent être identiques ;

- R_2 et R_4 = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles). R_2 et R_4 peuvent

15 être identiques ;

- n, compris entre 3 et 20, est défini pour chaque composé.

3. Polymères acétylés :



$X = \text{CH}_2\text{OH}$ ou CO_2H

20 R = H, alkyl, alkyl substitué.

Selon la configuration L ou D des aminoacides utilisés :

- R_1 et R_3 = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles). R_1 et R_3 peuvent être identiques ;

25 - R_2 et R_4 = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels (protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles). R_2 et R_4 peuvent être identiques ;

- n, compris entre 3 et 30, est défini pour chaque composé.

Exemple de procédé de synthèse des composés purs

La synthèse des composés 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14 et 15 est réalisée en phase solide en stratégie Fmoc. La résine choisie est de type 2-chlorotrityle (Senn, 1,8 mmoles/g).

- 5 Les couplages sont effectués en présence de HOBt (2.5 équivalents) / HBTU (2.5équivalents) / DIEA (4 équivalents).

Le solvant utilisé pour l'introduction des Fmoc-aminoacides est le diméthylformamide. Le groupe Fmoc est clivé par une solution de pipéridine à 20% dans le diméthylformamide.

- 10 Greffage de l'aminoalcool :

La résine est agitée à température ambiante en présence du Fmoc-aminoalcool et de 6 équivalents de pyridine dans un mélange constitué de diméthylformamide et de dichlorométhane (1/1). Après 16 h de réaction, du méthanol est additionné à la résine et le mélange réactionnel est agité pendant 30 minutes.

- 15 Après filtration, le taux de charge de la résine est déterminé par analyse UV. Les spectres de masse ESI ont été enregistrés sur un spectromètre de masse (Micromass Platform II) en mode electrospray.

Exemple de synthèse : Composé 7

- 20 Couplage-déprotection : A 1g de résine préchargée en alaninol (taux de substitution 0,15 mmol.g⁻¹) en suspension dans du DMF, est ajoutée une solution de Fmoc-Ala dans le DMF puis une solution d'activation composée d'un mélange équimolaire d'HBTU et HOBt à 0,5 M et de 4 équivalent de DIEA dans le DMF. Le mélange est agité 6 heures puis traité par une solution de pipéridine à 20% dans le DMF. La résine est lavée avec une solution de dichlorométhane puis avec une solution
25 d'éther.

Clivage de la résine : La résine est transvasée de la vaisselle de réaction vers un tube à hémolyse auquel on a ajouté 4-5 ml d'une solution de TFA à 50% dans le dichlorométhane. Après 10 minutes sous agitation, la solution est filtrée et la résine lavée au dichlorométhane. Le solvant est évaporé sous vide.

- 30 Les composé 8 à 15 sont préparés en répétant n fois l'étape couplage-déprotection.

1 : Ac-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 10)

ES : [M + H]⁺ : 261.0, 402.5, 471.7, 544.4, 615.1, 686.4, 757.3, 808.9

2 : Ac-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 5)

ES : [M + H]⁺ : 373.2, 444.5 ET 515.3

- 35 3 : Ac-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 8)

- 11 -

- ES : $[M + H]^+$: 331.3, 402.2, 473.3, 544.6, 615.5, 685.3.
4 : Dodécyl-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 4)
 ES : $[M + H]^+$: 328.1, 400.0, 471.8, 542.0.
5 : Ac - Ala_n-Ala-ol (1 < n < 9)
 5 ES : $[M + H]^+$: 189.1, 260.0, 331.1, 402.0, 472.3, 544.5, 615.7, 686.5, 757.8
6 : H-Ala_n-Ala-ol (1 < n < 10)
 ES : $[M + H]^+$: 147.0, 218.0, 288.6, 360.1, 431.1, 502.1, 573.3, 786.5.
7 : H-Ala₁-Ala-ol (MW : 146)
 ES : $[M + H]^+$: 147.0
 10 **8 : H-Ala₂-Ala-ol (MW : 217)**
 ES : $[M + H]^+$: 218.0 ; $[M + NA]^+$: 240.0 ; $[2M + H]^+$: 434.8 ; $[2M + NA]^+$: 457.4
9 : H-Ala₃-Ala-ol (MW : 288)
 ES : $[M + H]^+$: 289.0
10 : H-Ala₄-Ala-ol (MW : 359)
 15 ES : $[M + H]^+$: 360.2 ; $[M + NA]^+$: 382.2 ; $[2M + H]^+$: 719.7 ; $[2M + NA]^+$: 741.5
11 : H-Ala₅-Ala-ol (MW : 430)
 ES : $[M + H]^+$: 431.4 ; $[M + NA]^+$: 453.5 ; $[2M + H]^+$: 861.3 ; $[2M + N]^+$: 883.8
12 : H-Ala₆-Ala-OH (MW : 501)
 ES : $[M + H]^+$: 502.4 ; $[M + N]^+$: 524.2
 20 **13 : H-Ala_n-Ala-OH (1 < n < 10)**
 ES : $[M + H]^+$: 160.9 ; 233.8 ; 303.1 ; 374.0 ; 445.2 ; 516.2 ; 587.3 ; 658.6 ;
 729.3 ; 800.8
14 : H-Ala₇-Ala-OH (MW : 572)
 ES : $[M + H]^+$: 573.3 ; $[M + NA]^+$: 595.4
 25 **15 : H-Ala₈-Ala-OH (MW : 643)**
 ES : $[M + H]^+$: 644.7 ; $[M + NA]^+$: 666.5 ; $[2M + H]^+$: 1288.1

EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES OLIGOPEPTIDES

1- Choix des marqueurs biochimiques sur plantes entières

a) Mesure de l'activité peroxydasique (enzyme endogène aux plantes)

- 30 Les peroxydases tiennent une place prépondérante dans les mécanismes de résistance des plantes.
- Elles participent à la production d'espèces actives de l'oxygène toxiques pour les agents pathogènes et sont impliquées dans la formation de la réaction hypersensible. Elles interviennent également dans la modification de la paroi
- 35 cellulaire. Il en résulte une augmentation de la synthèse de la lignine et/ou de

subérine (barrières mécaniques). De même, des pontages covalents entre les protéines de la paroi cellulaire sont réalisés. Elles permettent l'oxydation de phénols en quinones très toxiques et l'incorporation des flavonoïdes dans les parois (barrière chimique).

- 5 Compte tenu du rôle primordial des peroxydases dans la résistance des plantes, nous avons utilisé l'activité peroxydasique comme marqueur de la résistance suite aux traitements par des éliciteurs.

Afin de doser les activités peroxydasiques, les feuilles sont broyées en milieu tampon citrate-monohydrogène-phosphate-disodique. L'extrait est ensuite mis en
10 présence du gaïacol et d'eau oxygénée. Une réaction rapide se produit : le gaïacol est transformé en tétragaïacol. L'apparition du tétragaïacol dans le milieu nous permet de calculer l'activité peroxydasique.

Les dosages sont effectués dans ce même tampon en utilisant le gaïacol comme substrat. Les résultats sont exprimés en $\Delta DO / mn / g$ de matière fraîche.

- 15 b) Mesure de l'activité chitinasique

Afin de vérifier que les mécanismes de résistance sont déclenchés, nous avons également dosé une activité enzymatique apparaissant dans les situations de résistance : l'activité chitinasique (enzyme synthétisée dès l'attaque des parasites, qui dégrade la chitine, constituant des parois des champignons phytopathogènes).

- 20 Réaction colorimétrique utilisée : on utilise un tampon acétate :
solution de chitine + extrait enzymatique + tampon acétate qsp 0,5 ml (azur à 2 mg / ml) brut 50 mM – (pH5) (100 microlitres)

- incubation pendant 30 minutes à 37°C, et sous agitation continue.

- on arrête la réaction par addition d'une solution d'HCl 1N

- 25 - mesure colorimétrique au spectrophotomètre à 550 nm

L'activité chitinasique est exprimée en $\Delta DO / mn / g$ de matière fraîche.

Matériel végétal utilisé

- Toutes les plantes testées sont des jeunes plants obtenus par semis ou par bouturages. On pratique des pulvérisations des formulations obtenues à partir
30 d'oligopeptides. Ces formulations contiennent divers mouillants ou pénétrants capables de véhiculer la matière active (oligopeptides) jusqu'aux cellules.

EFFETS ELICITEURS D'OLIGOPEPTIDES

- Les effets éliciteurs d'oligopeptides de synthèse ont été étudiés chez plusieurs familles de plantes parmi lesquelles on peut citer : courgette, melon, concombre,
35 salade, blé, vigne.

Cas de courgettes

Des plants de courgette âgés de 3 semaines ont été traités par des oligopeptides.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau N° 1 (Planche 1/2).

D'après les résultats dudit tableau, on remarque que c'est le produit 6 qui possède

5 la plus forte activité élicitrice.

En admettant que la valeur de 100% d'activité peroxydasique est représentée par le produit 6, les produits 10 et 12 montrent une activité de 50%. Cette différence d'activité pourrait trouver son explication dans la diversité des structures chimiques de ces produits.

10 A des degrés différents, tous les autres produits ont montré une activité élicitrice. Les résultats obtenus indiquent que parmi les produits testés, les acides aminés libres sont beaucoup moins actifs par rapport aux oligopeptides. l'alaninol est le plus actif des résidus testés, suivi dans l'ordre par l'alanine, l'Aib et enfin le GABA. Ces résultats expriment clairement le pouvoir éliciteur des oligopeptides.

15 Cas de la vigne

Des plants de vigne âgés de 3 semaines ont été traités par des oligopeptides. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux N° II, III. (Planche 1/2)

La correspondance entre structure et code des produits synthétisés est communiqué dans le tableau N° IV (Planche 2/2).

20 EFFET DE PROTECTION ANTI-PATHOGENIQUE DES OLIGOPEPTIDES

Exemple 1 : Effet contre la fusariose du melon

La pulvérisation d'oligopeptides formulés sur des plants de melon de sept jours et inoculés par *fusarium oxysporum fsp melonis* quatre jours avant, permet d'obtenir une protection contre le pathogène. Parallèlement, un lot de plantules témoins a vu
25 ses feuilles pulvérisées avec de l'eau.

Dix jours après inoculation, les symptômes apparaissent uniquement chez les plants inoculés traités avec de l'eau. Trois semaines après l'infection, ces jeunes plants infectés se dessèchent et meurent.

Les plants inoculés et traités avec les oligopeptides ne présentent pas de
30 symptômes avant six semaines et continuent ensuite à se développer normalement. Ces résultats expriment clairement le pouvoir éliciteur de ces oligopeptides sur la résistance des plants de melon vis-à-vis du *fusarium sp.*

Exemple 2 : Effet contre les maladies aériennes du melon

En pulvérisant des oligopeptides sur des jeunes plants de melon, on observe un
35 effet similaire de protection contre l'oïdium.

Cinq jours après inoculation du pathogène, les symptômes n'apparaissent que sur les plants traités avec de l'eau. Ceux traités avec les oligopeptides ne présentent que peu ou pas de symptômes et continuent à se développer normalement trois semaines après inoculation.

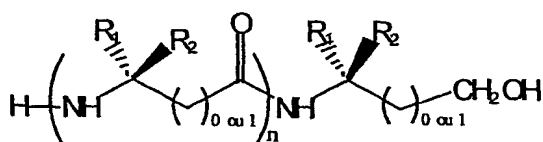
- 5 Selon les caractéristiques de base de l'invention, les oligopeptides utilisés comme éliciteurs :
- sont obtenus par voie de synthèse organique ou enzymatique ;
 - ont la particularité d'être des hétéro et/ou homopolymères d'acides aminés, protéiques ou non protéiques, constituant des séquences desdits polymères qui
 - 10 sont choisis pour leur propriété à former des structures des types hélicoïdales ou sous forme de feuillets β .
- La composition selon l'invention peut :
- comporter au moins un oligopeptide comprenant au moins un acide aminé des types protéique, naturel et/ou synthétique, et/ou non protéique, naturel et/ou
 - 15 synthétique ;
 - se présenter soit sous la forme liquide, notamment de solution aqueuse, soit sous la forme solide, notamment de poudres, granulés ou en enrobage de semences.
- Les oligopeptides utilisés peuvent être incorporés à un véhicule utilisé en agriculture de type mouillant et pénétrant.
- 20 L'utilisation des oligopeptides, selon l'invention, ont pour effet de réduire, lorsqu'ils sont appliqués :
- aux céréales, notamment le blé, le maïs et le riz, l'attaque des oïdiums, des septorioses, des rouilles, des fusarioses, des pyricularioses et des maladies bactériennes et virales ;
 - 25 - aux arbres fruitiers, notamment le poirier et le pommier, l'attaque des oïdiums, tavelures, des monilioses, des maladies bactériennes et virales telles que la « Sharka » ;
 - à la vigne, l'attaque de l'oïdium, du mildiou, du Botrytis, des maladies du bois, des maladies telluriques et virales telles que le « Court-Noué » ;
 - 30 - aux gazons et en horticulture, les attaques des pythiacées, champignons à sclérotés, fusarioses, oïdiums, maladies bactériennes et virales ;
 - aux oléagineux, notamment le soja, le tournesol, le melon, la carotte, le chou-fleur et la pomme de terre, l'attaque des oïdiums, des mildious, des pythiacées (*Phytophthora*, *Pythium*), des champignons à sclérotés (*Rhizoctonia*, *Sclerotinia*,

Pyrenocheta), des champignons vasculaires (*Fusarium*, *Verticillium*), des maladies bactériennes et virales.

REVENDICATIONS

1- Oligopeptides utilisés comme éliciteurs des défenses naturelles des plantes contre les pathogènes fongiques et/ou bactériens et/ou viraux et/ou ravageurs par application foliaire, racinaire ou par injection ; caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par voie de synthèse organique ou enzymatique ; en ce qu'ils ont la particularité d'être des homopolymères d'acides aminés protéiques et/ou non protéiques et en ce que lesdits acides aminés constituent des séquences desdits polymères qui sont choisis pour leur propriété à former des structures de type hélicoïdales.

2- Oligopeptides, selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils présentent la formule suivante :



dans laquelle R = H, alkyl, alkyl substitué ;

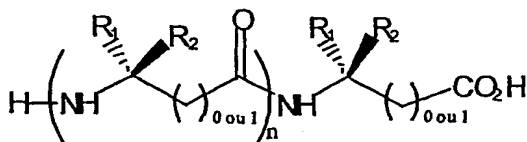
selon la configuration L ou D des aminoacides utilisés : R₁ et R₂ = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels, protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles : R₁ et R₂ pouvant être identiques ;

le côté N terminal des homopolymères étant ou non acylé ;

n étant compris entre 3 et 30 dans le cas d'homopolymères obtenus en mélange ;

n étant compris entre 3 et 20 dans le cas d'homopolymères purs et caractérisés.

3- Oligopeptides, selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils présentent la formule suivante :



dans laquelle R = H, alkyl, alkyl substitué ;

selon la configuration L ou D des aminoacides utilisés : R₁ et R₂ = H, alkyl, alkyl substitué ou chaîne latérale des acides aminés naturels ou non naturels, protégée dans le cas de chaînes fonctionnelles : R₁ et R₂ pouvant être identiques ;

le côté N terminal des homopolymères étant ou non acylé ;

n étant compris entre 3 et 30 dans le cas d'homopolymères obtenus en mélange ;

n étant compris entre 3 et 20 dans le cas d'homopolymères purs et caractérisés.

- 17 -

4- Composition caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un oligopeptide obtenu selon l'une quelconque des revendications précédentes et comprenant au moins un acide aminé de type protéique et/ou non protéique.

5 5- Composition, selon la revendication 4, caractérisée les oligopeptides utilisés sont incorporés à un véhicule utilisé en agriculture de type mouillant et pénétrant.

6- Composition, selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme liquide, notamment de solution aqueuse.

10 7- Composition, selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme solide, notamment de poudres, granulés ou en enrobage de semences.

8- Utilisation des oligopeptides, tels que définis dans l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisés en ce qu'ils ont pour effet de réduire, lorsqu'ils sont appliqués :

- 15 - aux céréales, notamment le blé, le maïs et le riz, l'attaque des oïdiums, des septorioses, des rouilles, des fusarioses, des pyricularioses et des maladies bactériennes et virales ;
- aux arbres fruitiers, notamment le poirier et le pommier, l'attaque des oïdiums, tavelures, des monilioses, des maladies bactériennes et virales telles que la
- 20 « Sharka » ;
- à la vigne, l'attaque de l'oïdium, du mildiou, du Botrytis, des maladies du bois, des maladies telluriques et virales telles que le « Court-Noué » ;
- aux gazons et en horticulture, les attaques des pythiacées, champignons à sclérotés, fusarioses, oïdiums, maladies bactériennes et virales ;
- 25 - aux oléagineux, notamment le soja, le tournesol, le melon, la carotte, le chou-fleur et la pomme de terre, l'attaque des oïdiums, des mildious, des pythiacées (*Phytophthora*, *Pythium*), des champignons à sclérotés (*Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pyrenocheta*), des champignons vasculaires (*Fusarium*, *Verticillium*), des maladies bactériennes et virales.

Produit (3.5 mg/L)	Activité peroxydasique ($\Delta DO/min/cmF$)	% d'activité peroxydasique par rapport au produit le
7	99.16	28.49
8	94.6	27.18
9	112	32.18
10	194	55.74
11	102	29.31
12	175	50.28
6	348	100
Alaninol	69.46	19.96
Alanine	65.78	18.9
Aib	53.1	15.26
GABA	49.1	14.11
Mouillant seul	73.5	13.95
Témoins non	47.77	13.72

Tableau N°I

Produit	Activité peroxydasique	% d'activité peroxydasique par rapport au produit le plus actif
TNT	164.59	71.68
6	187.5	81.66
13	136.6	59.49
Produit de référence	229.59	100

Tableau N°II

Produit	Activité chitinasique	% d'activité chitinasique par rapport au produit le plus actif
TNT	17.059	26.12
6	45.4	80.94
13	65.3	100
Produit de	56.09	85.89

Tableau N°III

Correspondance entre structure et code des produits synthétisés

Produit	Structure
1	Ac-(Ala) <i>n</i> -Alaol
2	Ac-(Ala) <i>n</i> -Alaol-Ac
3	Ac-(Ala) <i>n</i> -Alaol
4	Dodécyl-(Ala) <i>n</i> -Alaol
5	Ac-(Ala) <i>n</i> -Alaol
6	H-(Ala) <i>n</i> -Alaol
7	H-Ala-Alaol
8	H-(Ala) ₂ -Alaol
9	H-(Ala) ₃ -Alaol
10	H-(Ala) ₄ -Alaol
11	H-(Ala) ₅ -Alaol
12	H-(Ala) ₆ -Alaol
13	H-(Ala) <i>n</i> -COOH
14	H-(Ala) ₇ -Alaol
GABA	Acide γ -aminobutyrique
Aib	Acide α -aminoisobutyrique
T.N.T	Témoin non traité

Tableau N° IV

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/01021

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K7/06 C07C237/22 C07K5/062 C07K5/083 C07K5/103
A01N37/46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C07C A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, WPI Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 100 13 294 A (BASF AG) 20 September 2001 (2001-09-20) the whole document ---	1-8
T	WO 01 98501 A (EDEN BIOSCIENCE CORP) 27 December 2001 (2001-12-27) claims; examples ---	1-8
X	WO 01 04347 A (XOMA TECHNOLOGY LTD; LITTLE ROGER G ; ABRAHAMSON SUSAN (US)) 18 January 2001 (2001-01-18) page 9, line 15 - line 22; claims; examples page 20, line 19 - line 22 --- -/--	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 2004

Date of mailing of the international search report

21/01/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Keller, Y

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/01021

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHAKRABARTTY A ET AL: "STABILITY OF ALPHA-HELICES" ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 46, 1995, pages 141-176, XP000979146 ISSN: 0065-3233 page 145, paragraph 3 -page 150, paragraph 3; table I</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/01021

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 10013294	A	20-09-2001	DE 10013294 A1	20-09-2001
			AU 4247101 A	24-09-2001
			WO 0167867 A2	20-09-2001
WO 0198501	A	27-12-2001	AU 7546501 A	02-01-2002
			CA 2411896 A1	27-12-2001
			CN 1457363 T	19-11-2003
			EP 1299543 A2	09-04-2003
			WO 0198501 A2	27-12-2001
			US 2002062500 A1	23-05-2002
WO 0104347	A	18-01-2001	AU 4204800 A	30-01-2001
			CA 2379119 A1	18-01-2001
			WO 0104347 A1	18-01-2001
			US 6376211 B1	23-04-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

FR03/01021

The current claims 1-8 relate to an inordinately large number of compounds, products, devices or methods, of which only a small proportion are supported by the description (PCT Article 6) and or disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure in the description to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed to the parts of the claims that appear to be supported and disclosed in the above sense, namely the parts relating to the compounds or products. Only the compounds 1 to 15 (pages 10 and 11 of the description) have been searched.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.